

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

AD

(11)Publication number : 06-030771

(43)Date of publication of application : 08.02.1994

(51)Int.Cl.

C12N 9/10

C12N 15/62

(21)Application number : 04-187038

(71)Applicant : AJINOMOTO CO INC

(22)Date of filing : 14.07.1992

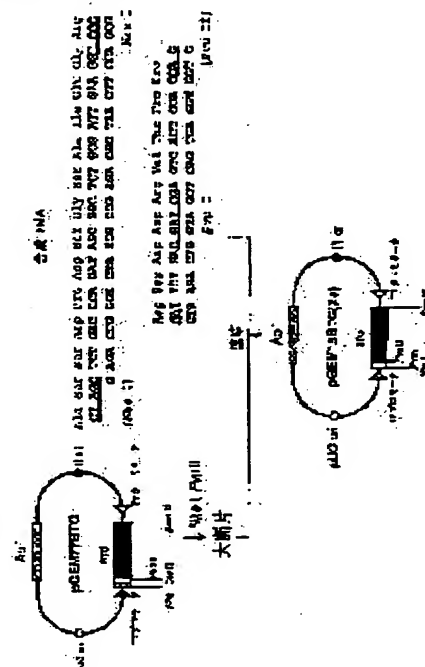
(72)Inventor : KAWAI MISAKO
TAKEHANA SHINO
TAKAGI HIROSHI

(54) PRODUCTION OF BACTERIAL TRANSGLUTAMINASE AND RELATED MATERIAL

(57)Abstract:

PURPOSE: To mass produce bacterial transglutaminase by using a bacterium such as Escherichia coli.

CONSTITUTION: Escherichia coli retaining a plasmid manifesting a fused protein containing bacterial transglutaminase and a hydrophilic peptide existing at the amino end side of the bacterial transglutaminase is cultured to produce a bacterial transglutaminase-fused protein as an inert sealed material in cells. The sealed material is recovered from the cells, the sealed material is solubilized by using a denaturing agent and the denaturing agent is removed to give a fused protein having transglutaminase activity.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-30771

(43)公開日 平成6年(1994)2月8日

(51)Int.Cl.⁵C12N 9/10
15/62

識別記号

ZNA

庁内整理番号

9359-4B

FI

技術表示箇所

8931-4B

C12N 15/00

A

審査請求 未請求 請求項の数8(全13頁)

(21)出願番号 特願平4-187038

(22)出願日 平成4年(1992)7月14日

(71)出願人 000000066

味の素株式会社

東京都中央区京橋1丁目15番1号

(72)発明者 河合 美佐子

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1味の素
株式会社中央研究所内

(72)発明者 竹鼻 志乃

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1味の素
株式会社中央研究所内

(72)発明者 高木 博史

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1味の素
株式会社中央研究所内

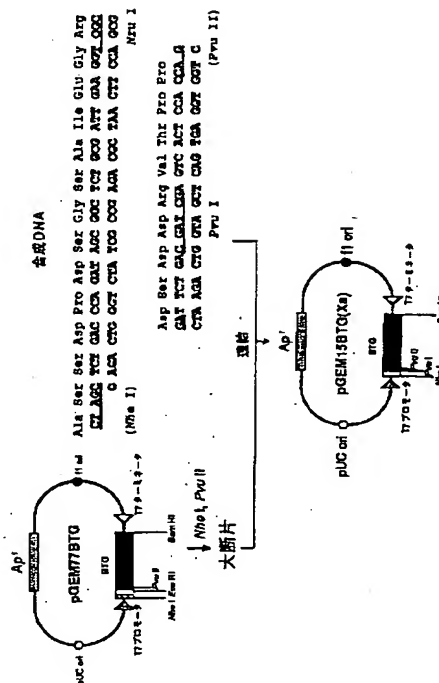
(74)代理人 弁理士 遠山 勉 (外2名)

(54)【発明の名称】 バクテリアトランスグルタミナーゼの製造法及び関連物

(57)【要約】

【目的】 大腸菌等の微生物を用いて、バクテリアトランスグルタミナーゼを大量に生産させる。

【構成】 バクテリアトランスグルタミナーゼと、このバクテリアトランスグルタミナーゼのアミノ末端側において親水性であるペプチドを含む融合タンパクを発現するプラスミドを保持する大腸菌を培養することにより、菌体内に不活性封入体としてバクテリアトランスグルタミナーゼ融合タンパクを生産させ、菌体からこの封入体を回収し、この封入体を変性剤を用いて可溶化した後、変性剤を除去することにより、トランスグルタミナーゼ活性を有する融合タンパクを得る。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1に示すアミノ酸配列のうち16～346番のアミノ酸配列を有するバクテリアルトランスグルタミナーゼと、このバクテリアルトランスグルタミナーゼのアミノ末端側にあつて親水性であるペプチドを含む融合タンパク。

【請求項2】 配列番号1に示すアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項1記載の融合タンパク。

【請求項3】 配列番号1に示すアミノ酸配列のうち16～346番のアミノ酸配列を有するバクテリアルトランスグルタミナーゼと、このバクテリアルトランスグルタミナーゼのアミノ末端側にあつて親水性であるペプチドを含む融合タンパクをコードするDNA配列。

【請求項4】 請求項3記載のDNA配列において、前記バクテリアルトランスグルタミナーゼをコードする配列部分と、親水性であるペプチドをコードする配列部分との間に、制限プロテアーゼの認識配列をコードするDNA配列を有することを特徴とするDNA配列。

【請求項5】 配列番号1に示す塩基配列を有する請求項3又は4記載のDNA配列。

【請求項6】 請求項3～5のいずれか一項に記載のDNA配列と、大腸菌で発現可能なプロモーターとを有するプラスミド。

【請求項7】 請求項6記載のプラスミドを保持するエシェリキア・コリ。

【請求項8】 請求項7記載のエシェリキア・コリを培養することにより菌体内に不活性封入体としてバクテリアルトランスグルタミナーゼ融合タンパクを生産させ、菌体からこの封入体を回収し、この封入体を変性剤を用いて可溶化した後、変性剤を除去することにより、トランスグルタミナーゼ活性を有する融合タンパクを得ることを特徴とするバクテリアルトランスグルタミナーゼの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、バクテリアルトランスグルタミナーゼの製造法及び関連物に関し、詳しくは、エシェリキア・コリ（大腸菌）により生産される不活性なタンパク封入体から効率よく活性を持つタンパクに再生させることによりトランスグルタミナーゼを製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 トランスグルタミナーゼは、タンパクのペプチド鎖内にあるGln残基の γ -カルボキシアミド基のアシル転移を触媒する酵素である。本酵素をタンパクに作用させると、 ϵ -(γ -Gln)-Lys架橋形成反応、Glnの脱アミド化によるGluへの置換反応が起こりうる。

【0003】 このトランスグルタミナーゼは、ゼリー等のゲル状食品、ヨーグルト、チーズ、あるいはゲル状化粧品などの製造や食肉の肉質改善等に利用されている

（例えば、特公平1-50382号公報）。また、熱に安定なマイクロカプセルの素材、固定化酵素の担体などの製造に利用されているなど、産業上利用性の高い酵素である。

【0004】 トランスグルタミナーゼは、これまで、動物由来のものとバクテリア由来のもの（バクテリアルトランスグルタミナーゼ：以下、「BTG」という。）についてその一次構造が判明している。

【0005】 前者は、カルシウムイオン依存性の酵素であり、動物の臓器、皮膚、血液などに分布している。その例としては、モルモット肝トランスグルタミナーゼ（K. Ikura *et al.* *Biochemistry* 27, 2898(1988)）、ヒト表皮ケラチン細胞トランスグルタミナーゼ（M. A. Phillips *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 9333 (1990)）、ヒト血液凝固因子XIII（A. Ichino *et al.* *Biochemistry* 25 6900(1990)）などがあり、モルモット肝トランスグルタミナーゼについては、大腸菌においての発現生産の報告がある（伊倉宏司ら、昭和63年日本農芸化学会大会要旨集、p62）。

【0006】 後者については、ストレプトベルチシリウム属の菌から、カルシウムイオン非依存性のものが発見されている。その例としては、ストレプトベルチシリウム・グリセオカルネウム（*Streptovorticillium griseo carneum*）IFO 12776、ストレプトベルチシリウム・シナモネウム・サブ・エスピー・シナモネウム（*Streptovorticillium cinamomeum* sub sp. *cinamomeum*）IFO 12852、ストレプトベルチシリウム・モバラエンス（*Streptovorticillium mobaraense*）IFO 13819等が挙げられている（特開昭64-27471）。

【0007】 これらのバクテリアが生産するトランスグルタミナーゼの一次構造は、ペプチドマッピング及び遺伝子構造解析の結果、動物由来のものとは相同性を全く持たないことが判明している（ヨーロッパ特許公開公報 0 481 504 A1）。

【0008】 ところで、従来、トランスグルタミナーゼは上記動物や菌類等から製造されていたため、供給量、効率等の点で問題があった。そのために、本願発明者らのグループにより、遺伝子工学的手法によるBTGの生産をめざして、例えば、大腸菌において、直接発現、ペリプラスムへの分泌発現等が試みられている（ヨーロッパ特許公開公報 0 481 504 A1）。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、前述したように、BTGは、カルシウムイオン非依存性であるので、大腸菌等の微生物で生産させると、菌体の生育に必要なタンパクに本酵素が作用するため致命的になったり、生産量が低くなるなどの問題があった。

【0010】 したがって、遺伝子組換えにより生産されるBTGを工業的に利用するためには、生産量を増大させることが望まれる。本発明は、上記観点からなされた

ものであり、大腸菌等の微生物を用いて、BTGを大量に生産させることを課題とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決するために、強力なプロモータの一つであるtrpプロモータの制御下、BTGを不活性なタンパク封入体として大量発現させようと試みたが、BTGの微量の発現がみられたに過ぎず、形質転換体が致死的になった（後述比較例参照）。

【0012】そこで、これらの問題を克服するために鋭意研究を行った結果、大腸菌でBTGを不活性融合タンパク封入体として生産、蓄積させた後、この封入体をタンパク変性剤で可溶化し、脱変性剤過程を経て活性再生させることにより、トランスグルタミナーゼ活性を持つタンパクを大量生産することができることを見出し、本発明に至った。

【0013】すなわち本発明は、バクテリアルトランスグルタミナーゼとこのバクテリアルトランスグルタミナーゼのアミノ末端側において親水性であるペプチドとを含む融合タンパク、この融合タンパクをコードするDNA配列、このDNA配列と大腸菌で発現可能なプロモーターとを有するプラスミド、このプラスミドを保持する大腸菌、及びこの大腸菌を培養することにより菌体内に不活性封入体としてバクテリアルトランスグルタミナーゼ融合タンパクを生産させ、菌体からこの封入体を回収し、この封入体を変性剤を用いて可溶化した後、変性剤を除去することにより、トランスグルタミナーゼ活性を有する融合タンパクを得ることを特徴とするバクテリアルトランスグルタミナーゼの製造法である。

【0014】以下、本発明を詳細に説明する。一般的に、タンパクを大腸菌等の微生物で大量生産させると、そのタンパクが会合し、タンパクの封入体を形成する場合が多い。この発現生産方法は、目的のタンパクを菌体内のプロテアーゼによる消化から保護する、あるいは、菌体破碎に続く遠心分離で簡単に精製できる等の利点がある。

【0015】このようにして得られるタンパク封入体は、タンパク変性剤により可溶化され、主にその変性剤を除去することによる活性再生操作を経た後、正しく折り畳まれた生理的に活性なタンパクに変換させることができる。例えば、ヒトインターロイキン-2の活性再生（特開昭61-257931号）等多くの例がある。

【0016】タンパク封入体から活性型タンパクを得るためには、可溶化・活性再生等の一連の操作が必要であり、直接活性型タンパクを生産させるよりも操作が複雑になる。しかし、菌体の生育に影響を及ぼすようなタンパクを発現生産させる場合は、不活性なタンパク封入体として菌体内に蓄積させることにより、その影響を抑えることができる。

【0017】このように、目的タンパクを封入体として

大量生産させる方法として、強力なプロモータの制御下、目的のタンパクを単独で発現させる方法の他、大量発現することが知られているタンパクとの融合タンパクとして発現させる方法がある。

【0018】さらに、融合タンパクとして発現させた後に、目的のタンパクを切り出すため、制限プロテアーゼの認識配列を適当な位置に配しておくことも有効である。かかる観点から、本発明のBTG製造法は、大腸菌で不活性融合タンパク封入体としてBTGを大量発現させ、これを活性体へと効率よく再生させることからなる。以下に、本発明を分説する。

【0019】＜1＞BTG融合タンパク発現系

はじめに、大腸菌でBTGを不活性融合タンパク封入体として生産させる発現系を説明する。

【0020】本発明に用いるBTG遺伝子として特に制限はないが、ストレプトベルチシリウム属の放線菌のBTG遺伝子が挙げられる。この遺伝子を有し、大腸菌のペリプラズムへの分泌生産を行うプラスミドpOMPABTG（ヨーロッパ特許公開公報 0481 504 A1：図1）を保持する大腸菌は、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている（FERM BP-3558）。BTG遺伝子は、このプラスミドから、EcoRIとBamHIで切断することにより回収することができる。

【0021】尚、上記プラスミド中のBTG遺伝子は、ストレプトベルチシリウム属菌より精製されたBTGのアミノ酸配列をもとに、大腸菌や酵母のコード使用頻度に合わせて合成されたものであり、大腸菌のompAのシグナルペプチドをコードする配列の下流に連結されている。

【0022】上記BTG遺伝子を発現させるプロモータとしては、通常大腸菌における異種タンパク生産に用いられるプロモータを使用することができ、例えば、T7プロモータ、trpプロモータ、lacプロモータ、tacプロモータ、PLプロモータ等の強力なプロモータが挙げられる。

【0023】BTGを融合タンパク封入体として生産させるために、BTG遺伝子の上流あるいは下流に、他のタンパク、好ましくは親水性であるペプチドをコードする他の遺伝子を連結して、BTG融合タンパク遺伝子とする。このような他の遺伝子としては、BTGとの融合タンパクの蓄積量を増加させ、変性・再生工程後に溶解性を高めるものであればよく、例えば、T7 gene 10、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、デヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、インターフェロン γ 遺伝子、インターロイキン-2遺伝子、プロキモシン遺伝子等が候補として挙げられる。

【0024】これらの遺伝子とBTG遺伝子との連結は、コードンの読み取りフレームが一致する適当な制限酵素部位で連結するか、あるいは適当な配列の合成DNAを利用すればよい。

【0025】後述の実施例中<1>では、市販のpGEMEX系ベクター（プロメガ製）を用いて大腸菌で不活性なタンパク封入体として、T7 gene 10とのBTG融合タンパクを大量発現させた。しかし、このBTG融合タンパクは、変性剤で可溶化した後に透析により変性剤を除去すると、溶解性が極端に低下し、可溶画分には僅かしかトランスグルタミナーゼ活性が認められなかった。

【0026】そのため、実施例中<3>で説明するように、融合タンパク部分の疎水性の高い配列を欠失させるなどしたところ、大腸菌でこのBTG融合タンパクもタンパク封入体として大量発現した。この融合タンパクは、変性剤の除去後も溶解性は高く、なおかつ活性体へと再生された。したがって、本発明の融合タンパクに使用するには、親水性のタンパクが好ましいと推察され、上掲した各遺伝子のうち、疎水性部分に相当する配列を除いたものを使用するとよい。本発明にいう「親水性であるペプチド」とは、かかる意味での疎水性の高い配列を除いたペプチドである。

【0027】上記融合タンパク遺伝子は大腸菌に導入させるためのベクターとしては、いわゆるマルチコピー型のものが好ましく、Col E1由来の複製開始点を有するプラスミド、例えばpUC系のプラスミドやpBR322あるいはその誘導体が挙げられる。また、形質転換体を選別するために、アンピシリン耐性遺伝子等のマーカーを有することが好ましい。このようなプラスミドとして、強力なプロモーターを持つ発現ベクターが市販されている（pUC系（宝酒造 他製）、pPROK系（クロンテック製）、pK K233-2（クロンテック製）ほか）。これらのいずれを用いても生産が可能ということは、容易に類推できる。

【0028】また、生産量を増大させるためには、融合タンパク遺伝子の下流に転写終結配列であるターミネーターを連結することが好ましい。このターミネーターとしては、T7ターミネーター、fdファージターミネーター、T4ターミネーター、テトラサイクリン耐性遺伝子のターミネーター、大腸菌trpA遺伝子のターミネーター等が挙げられる。

【0029】上記ベクターに、プロモーター、融合タンパク遺伝子、ターミネーターの順に連結したDNA断片が挿入されたプラスミドを大腸菌に導入し、この大腸菌を培養すると、BTG融合タンパクが発現生産される。

【0030】本発明のBTG融合タンパクをコードする塩基配列を配列表（配列番号1）に例示する。この配列中のコドン等を等価のコドンに置き換えた配列も同様に使用できる。

【0031】また、配列表配列番号1及び2に示すベクターの配列由来の融合タンパク部分の配列の一部を、欠失・挿入・置換しても、タンパク封入体として高発現しうるし、またタンパク変性剤を除去することにより活性再生されうる。このことは、後述の実施例から推測される。

【0032】さらに、他の高発現ベクターにBTG遺伝

子を連結し、上記と類似の方法を用いて、トランスグルタミナーゼ活性を持つBTG融合タンパクを得ることも可能と考えられる。高発現ベクターとしては、T7 gene 10とリンカーペプチドとの融合タンパクを高発現する発現ベクタープラスミドがインビトロジェン社からXpress System™の商品名で、グルタチオン-S-トランスフェラーゼとの融合タンパクを高発現する発現ベクタープラスミドは、ファルマシアLKB社からpGEX系プラスミドとして市販されている。

【0033】融合タンパクとして発現させた場合、実施例に示す血液凝固因子Xaのほか、カリクレインなどの、BTG内に存在しない配列を認識配列とする制限プロテアーゼを用いてトランスグルタミナーゼを切り出せるようにしてもよい。

【0034】発現系に用いる大腸菌としては、通常、異種遺伝子の発現に用いられる株を使用することができるが、特に大腸菌 JM109 (DE3) 株、JM109株が好ましい。

【0035】<2>大腸菌によるBTG融合タンパクの発現生産

上記BTG融合タンパクを発現するプラスミドを導入した大腸菌を培養することにより、BTG融合タンパクが生産される。

【0036】生産培地としては、実施例で述べるM9-カザミノ酸培地の他、LB培地などの通常大腸菌を培養するのに用いる培地を用いてもよい。また、培養条件、生産誘導条件は、用いたベクターのマーカー、プロモーター、宿主菌等の種類に応じて適宜選択する。

【0037】<3>タンパク封入体からの活性再生
生産されたタンパク封入体を変性剤で可溶化する。菌体タンパクとともに可溶化してもよいが、精製等を考慮すると、封入体を取り出して、これを可溶化するのが好ましい。封入体を菌体から回収するには、従来公知の方法で行えばよい。例えば、菌体を破壊し、遠心分離等によって封入体を回収する。

【0038】タンパク封入体を可溶化させる変性剤としては、グアニジン塩酸（例えば、6M、pH5~8）や尿素（例えば8M）などが挙げられる。これらの変性剤を透析等により除くと、活性を有するタンパクとして再生される。透析に用いる透析溶液としては、トリス塩酸緩衝液やリン酸緩衝液などを用いればよく、濃度としては20mM~0.5M、pHとしては5~8が挙げられる。

【0039】再生工程時のタンパク濃度は、500μg/ml程度以下に抑えるのが好ましい。透析温度は、再生したBTG活性による自己架橋を抑えるために、5℃以下で行うことが好ましい。また、変性剤除去の方法として、この透析法のほか、希釈法、限外濾過法などがあり、いずれを用いても活性の再生が期待できる。

【0040】

【実施例】以下、本発明の実施例を、比較例と合わせて

説明する。尚、本実施例、後述の比較例中で使用した制限酵素は、宝酒造(株)の製品を用いた。

【0041】<1>T7 gene 10とBTGとの融合タンパクの生産

市販の大腸菌宿主ベクター系、*Escherichia coli* (*E. coli*) JM109 (DE3)-pGEMEX-1 (プロメガ製)を用いて、T7 gene 10産物のアミノ末端側部分とBTGとの融合タンパクを発現生産させた。

【0042】この系は、ベクターpGEMEX-1のT7プロモータ下流のマルチクロニングサイトに組み込んだ遺伝子を、約260アミノ酸残基からなるT7 gene 10産物との融合タンパクとして大量発現するものである。発現のための宿主 *E. coli* JM109 (DE3)は、*E. coli* JM109の染色体上に、*lacUV5*プロモータの制御下で発現するように、T7 RNAポリメラーゼ遺伝子 (T7 gene 1)を組み込んだものである。従って、*lacUV5*プロモータの誘導剤であるIPTG (イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド) 添加によりT7 RNAポリメラーゼが大量発現するため、T7プロモータ直下に挿入された遺伝子の発現が誘導される (Studier, F. and Moffatt, B. *J. Mol. Biol.*, 189, 113 (1986))。

【0043】BTG融合タンパク発現プラスミドpGEM260BTGの構築法を、図1に示す。すなわち、BTGを大腸菌のペリプラズムへ分泌させるプラスミドpOMPA-BTG (ヨーロッパ特許公開公報 0 481 504 A1) から、制限酵素EcoRI、BamHIで切り出したBTG遺伝子を、pGEMEX-1のマルチクロニングサイト内のEcoRI、BamHI間に挿入した。尚、プラスミドpOMPA-BTGを保持する大腸菌JA2 21株は、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている (FERM BP-3558)。

【0044】このようにして構築したpGEM260BTGで形質転換した*E. coli* JM109 (DE3)を、50 μg/mlのアンプシリンを含むM9-カザミノ酸培地で37℃にて振盪培養し、OD₅₇₀が0.4に達した時点で終濃度が1 mMになるようにIPTGを添加し、さらに37℃で3時間振盪培養した。

【0045】全菌体抽出物を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動した後、クマジー・ブリリアント・ブルー染色により、BTG融合タンパクが大量発現していることが確認された。

【0046】<2>融合タンパク部分の短鎖化
次に、不活性なタンパク封入体として大量発現し、活性型へと再生し得るようなBTG融合タンパクを生産することを目指し、融合タンパクのうちT7 gene 10部分を除去するために、<1>で得られたpGEM260BTG中の相当する部分の配列を欠失させたプラスミドを作製した。

【0047】その構築法を図2に示す。まず、pGEM260BTGを制限酵素NheIで切断し、切断末端をDNA Blunting Kit (宝酒造製)で平滑化した後、BamHIで切断した大断片を回収した。

【0048】一方、pGEM260BTGをNheIで切断し、切断端

をExoIII-Mungbean Deletion Kit (ストラタジーン製)を用いて削った後、BamHIで切断して得られる小断片を回収した。この小断片と上記大断片とを連結し、*E. coli* JM109を形質転換した。得られたクローンの中からNheIで切断されるプラスミドを保持するクローンを選んだ。このNheI認識部位は開始コドン近傍に存在するため、このようなプラスミドは、この後の融合型BTG発現プラスミドの構築に便利である。

【0049】次に、これらのプラスミドで形質転換された*E. coli* JM109 (DE3)を、<1>と同様に培養し、菌体抽出物のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、クマジー・ブリリアント・ブルー染色、及びウサギ抗BTG抗体を用いたウエスタン・ブロッティングを行い、BTG融合タンパクを大量発現しているクローンを選択した。

選択されたクローンからプラスミドを回収し、融合タンパク遺伝子の塩基配列を決定した。この配列を、配列表配列番号2に示す。また、得られたプラスミドをpGEM77BTGとした。

【0050】このクローンを、50 μg/mlのアンプシリンを含むM9-カザミノ酸培地 (カザミノ酸0.2% (w/v)) に接種し、一晚37℃で前培養した。この培養液を、同培地 (但し、カザミノ酸2% (w/v)) に5%になるよう接種し、37℃で振盪培養を行い、OD₅₇₀が0.4になった時点でIPTGを終濃度1 mMになるように添加し、さらに3時間培養した。

【0051】BTG融合タンパクは、培養後の超音波破砕菌体抽出物のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、及びウエスタン・ブロッティングにより、菌体タンパクの不溶画分中のみ大量に検出された。このことは、BTG融合タンパクがタンパク封入体として菌体内に蓄積したことを示している。

【0052】この不溶画分から、10,000×g、10分の遠心分離によってタンパク封入体を得、これを20mM トリス塩酸 (pH7.5)-30mM NaClで2回洗浄した。このタンパク封入体を、6Mグアニジン塩酸-10mM EDTA (pH6.0)で可溶化した後、200mM トリス塩酸 (pH6.0)に対し、5℃で一昼夜、透析を行った。

【0053】このBTG融合タンパクの200mM トリス塩酸 (pH6.0)への溶解度はきわめて低く、可溶化ができなかった。従ってトランスグルタミナーゼの活性の検定は実施できなかった。

【0054】<3>活性再生可能な融合タンパクの生産
変性-再生処理後のBTG融合タンパクの溶解度を上げるため、pGEM77BTGの配列中、T7 gene 10産物部分の疎水度の高い領域に相当する配列を欠失させた発現プラスミドpGEM15BTG (Xa)を構築した。その構築法を図3に示す。また、融合型BTGをコードする部分の塩基配列とアミノ酸配列を、配列表配列番号1に示す。

【0055】すなわち、pGEM77BTGをNheIとPvuIIで切断し、合成DNA (配列番号1中5~73番の塩基配列に

相当)を挿入した。DNAの合成は、DNAシンセサイザー391(アプライドバイオシステムズ)を用い、ホスホアミダイト法により行った。

【0056】合成DNAの配列は、上述の疎水性の高い部分を欠失させるとともに、好ましくないジスルフィド架橋の生成を避けるため、融合タンパク部分に存在するCysをSer(配列番号1中アミノ酸番号4)に置換するように設計した。また、制限プロテアーゼである血液凝固因子Xaにより、融合タンパクからBTGを切り出すことができるように、Xaの認識配列Ile-Glu-Gly-Argを、BTGのアミノ末端に配した(配列番号1中アミノ酸番号12~15)。さらに、このIle-Glu-Gly-Arg配列がタンパク表面に露出し、認識・切断され易いように、この近傍のTyrをGly(配列番号1中アミノ酸番号9)に置換した。Xaでの切断による融合タンパクからの目的タンパクの切り出しは、すでにβ-グロブリンなどについて報告がある(K. Nagai, and H. C. Thogersen, *Nature*, 309, p810 (1984))。

【0057】このプラスミドpGEM15BTG(Xa)で形質転換した*E. coli* JM109(DE3)(AJ12745)は、工業技術院微生物工業技術研究所へ寄託した(FERM-P-13037)。この形質転換体を50μg/mlのアンピシリンを含むM9-カザミノ酸培地(カザミノ酸0.2%(w/v))に接種し、一晚37℃で前培養した。本培養では、これを同培地(但し、カザミノ酸2%(w/v))に5%になるよう接種し、37℃で振盪した。OD₅₇₀が0.4になった時点でIPTGを終濃度1mMになるように添加し、さらに3時間培養した。

【0058】BTG融合タンパクは、培養後の超音波破碎菌体抽出物のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、及びウエスタン・ブロッティングにより、タンパク封入体として菌体内に蓄積したことが確認された。

【0059】集菌した菌体を、20mM Tris-HCl(pH7.5)、30mM NaCl、50mM EDTAに懸濁し、超音波破碎した。これより10,000×g、10分の遠心分離によってタンパク封入体を得、これを20mMトリス塩酸(pH7.5)-30mM NaClで2回洗浄し、タンパク封入体を集めた。

【0060】これを6M Guanidinium chloride-10mM EDTA(pH6.0)で可溶化した後、200mMトリス塩酸(pH6.0)に対し、5℃で一昼夜、バッチ法、及び滴下透析法による透析を行った。

【0061】変性剤除去後の、この融合タンパクの溶解度は、約400μg/mlであった。再生BTGの活性を、ヒドロキサム酸を用いたトランスグルタミナーゼ活性測定法(Colorimetric hydroxamate procedure: J. E. Folk and P. W. Cole, *J. Biol. Chem.*, 241, 5518 (1966)を改良)により測定した。

【0062】ベンジルオキシカルボニル-L-グルタミルグリシンと、ヒドロキシルアミンを基質として、Ca²⁺存在下あるいは非存在下で反応を行い、生成したヒドロキサム酸をトリクロロ酢酸存在下で鉄錯体として形成

させ、525nmの吸収を測定し、ヒドロキサム酸の量を検量線より求め、活性を算出したところ、再生BTGの活性は、3.2Units/mgタンパクであった。尚、BTGを分泌生産させた場合には、ペリプラズム画分の活性は0.22U/mgタンパクであり(ヨーロッパ特許公開公報0 481 504 A1)、本発明により、10倍以上の活性を得ることができた。

【0063】さらに、血液凝固因子XaによるBTGの切り出しを行った。透析後の融合タンパク10μgに、血液凝固因子Xa(ダネックスバイオテック)1μgを添加し、200mMトリス塩酸溶液(pH6)(100mM NaCl、1mM CaCl₂)中、5℃で一晩反応させた。

【0064】血液凝固因子Xa反応後のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動とウエスタン・ブロッティングにより、BTGが切り出されたことを確認した。切断前後でトランスグルタミナーゼ活性は変わらなかったが、T7 gene 10に由来する不要な部分を除くことができるので、特に食品分野等では有用である。

【0065】

【比較例】

(trcプロモータを用いたBTGの生産) 比較例として、強力なプロモータの一つであるtrcプロモータの制御によるBTGの生産例を説明する。

【0066】pOMPA-BTG(ヨーロッパ特許公開公報0 481 504 A1)より制限酵素EcoRI、BamHIで切り出したBTG遺伝子を、市販の発現プラスミドpTrc99A(ファルマシア製)のtrcプロモータ下流のマルチクローニングサイト内のEcoRI、BamHI間に挿入した。

【0067】このようにして構築したpTrc-BTGで形質転換した*E. coli* JM109を、50μg/mlのアンピシリンを含むM9-カザミノ酸培地で37℃で振盪培養し、OD₅₇₀が0.4に達した時点で培養温度を23℃に下げた。そして、trcプロモータの誘導剤であるIPTGを終濃度が1mMになるように添加し、さらに3時間振とう培養した。前記M9-カザミノ酸培地は、M9培地(J. H. Miller編、Experiments in Molecular Genetics(Cold Spring Harbor, 1972))にカザミノ酸(VITAMIN ASSAY CASAMINO ACID(ディフコ製))を2%(w/v)になるように添加したものである。

【0068】培養後の菌体抽出物を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動した後、ゲルをクマジー・ブリリアント・ブルーで染色したが、本遺伝子産物は検出されなかった。しかし、ウサギ抗BTG抗体を用いたウエスタン・ブロッティングにより本遺伝子産物は確認され、ヒドロキサム酸を用いて測定したトランスグルタミナーゼ活性から概算すると、生産量は約20mg/l(培地)であった。

【0069】

【配列表】

【0070】配列番号: 1

配列の長さ: 1044

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA、及び、ベクター由来DNA

配列

ATG GCT AGC TCT GAC CCA GAT AGC GGC TCT GCG ATT GAA GGT CGC GAT	48
Met Ala Ser Ser Asp Pro Asp Ser Gly Ser Ala Ile Glu Gly Arg Asp	
1 5 10 15	
TCT GAC GAT CGA GTC ACT CCA CCA GCT GAA CCA TTG GAT AGA ATG CCA	96
Ser Asp Asp Arg Val Thr Pro Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro	
20 25 30	
GAT CCA TAC AGA CCA TCT TAC GGT AGA GCT GAA ACT GTT GTC AAC AAC	144
Asp Pro Tyr Arg Pro Ser Tyr Gly Arg Ala Glu Thr Val Val Asn Asn	
35 40 45	
TAC ATT AGA AAG TGG CAA CAA GTC TAC TCT CAC AGA GAT GGT AGA AAG	192
Tyr Ile Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Arg Lys	
50 55 60	
CAA CAA ATG ACT GAA GAA CAA AGA GAA TGG TTG TCT TAC GGT TGT GTT	240
Gln Gln Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu Trp Leu Ser Tyr Gly Cys Val	
65 70 75 80	
GGT GTT ACT TGG GTT AAC TCT GGT CAA TAC CCA ACT AAC AGA TTG GCT	288
Gly Val Thr Trp Val Asn Ser Gly Gln Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala	
85 90 95	
TTC GCT TCT TTC GAT GAA GAT AGA TTC AAG AAC GAA TTG AAG AAC GGT	336
Phe Ala Ser Phe Asp Glu Asp Arg Phe Lys Asn Glu Leu Lys Asn Gly	
100 105 110	
AGA CCA AGA TCC GGT GAA ACT AGA GCT GAA TTC GAA GGT AGA GTT GCT	384
Arg Pro Arg Ser Gly Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Val Ala	
115 120 125	
AAG GAA TCT TTC GAT GAA GAA AAG GGT TTC CAA AGA GCT AGA GAA GTT	432
Lys Glu Ser Phe Asp Glu Glu Lys Gly Phe Gln Arg Ala Arg Glu Val	
130 135 140	
GCT TCT GTT ATG AAC AGA GCT CTA GAA AAC GCT CAC GAT GAA TCT GCT	480
Ala Ser Val Met Asn Arg Ala Leu Glu Asn Ala His Asp Glu Ser Ala	
145 150 155 160	
TAC TTG GAT AAC TTG AAG AAG GAA TTG GCC AAC GGT AAC GAT GCT TTG	528
Tyr Leu Asp Asn Leu Lys Lys Glu Leu Ala Asn Gly Asn Asp Ala Leu	
165 170 175	
AGA AAC GAA GAT GCT AGA TCC CCA TTC TAC TCT GCT TTG AGA AAC ACT	576
Arg Asn Glu Asp Ala Arg Ser Pro Phe Tyr Ser Ala Leu Arg Asn Thr	
180 185 190	
CCA TCT TTC AAG GAA AGA AAC GGT GGT AAC CAC GAT CCA TCC AGA ATG	624
Pro Ser Phe Lys Glu Arg Asn Gly Gly Asn His Asp Pro Ser Arg Met	
195 200 205	
AAG GCT GTT ATT TAC TCT AAG CAC TTC TGG TCT GGT CAA GAT AGA TCT	672
Lys Ala Val Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser Gly Gln Asp Arg Ser	
210 215 220	
TCT TCT GCT GAT AAG AGA AAG TAC GGT GAT CCA GAT GCT TTC AGA CCA	720
Ser Ser Ala Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro Asp Ala Phe Arg Pro	
225 230 235 240	
GCT CCA GGT ACC GGT TTG GTC GAC ATG TCC AGA GAT AGA AAC ATT CCA	768

Ala Pro Gly Thr Gly Leu Val Asp Met Ser Arg Asp Arg Asn Ile Pro	
245 250 255	
AGA TCC CCA ACT TCT CCA GGT GAA GGT TTC GTC AAC TTC GAT TAC GGT	816
Arg Ser Pro Thr Ser Pro Gly Glu Gly Phe Val Asn Phe Asp Tyr Gly	
260 265 270	
TGG TTC GGT GCT CAA ACT GAA GCT GAT GCT GAT AAG ACT GTT TGG ACC	864
Trp Phe Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp Lys Thr Val Trp Thr	
275 280 285	
CAT GGT AAC CAC TAC CAC GCT CCA AAC GGT TCT TTG GGT GCT ATG CAC	912
His Gly Asn His Tyr His Ala Pro Asn Gly Ser Leu Gly Ala Met His	
290 295 300	
GTC TAC GAA TCT AAG TTC AGA AAC TGG TCT GAA GGT TAC TCT GAT TTC	960
Val Tyr Glu Ser Lys Phe Arg Asn Trp Ser Glu Gly Tyr Ser Asp Phe	
305 310 315 320	
GAT AGA GGT GCT TAC GTT ATT ACT TTC ATT CCA AAG TCT TGG AAC ACT	1008
Asp Arg Gly Ala Tyr Val Ile Thr Phe Ile Pro Lys Ser Trp Asn Thr	
325 330 335	
GCT CCA GAC AAG GTC AAG CAA GGT TGG CCA TAATGA	1044
Ala Pro Asp Lys Val Lys Gln Gly Trp Pro	
340 345	

【0071】配列番号：2

配列の長さ：1230

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA、及び、ベクター由来DNA

配列

ATG GCT AGC TGT GAC CCA GAT AGC TAC TCT GCG ATT CTG GCA GCA CTG	48
Met Ala Ser Cys Asp Pro Asp Ser Tyr Ser Ala Ile Leu Ala Ala Leu	
1 5 10 15	
ATG CCG AAC GCA GCA AAC TAC GCT GCT CTG ATT GAC CCT GAG AAG GGT	96
Met Pro Asn Ala Ala Asn Tyr Ala Ala Leu Ile Asp Pro Glu Lys Gly	
20 25 30	
TCT ATC CGC AAC GTT ATG GGC TTT GAG GTT GTA GAA GTT CCG CAC CTC	144
Ser Ile Arg Asn Val Met Gly Phe Glu Val Val Glu Val Pro His Leu	
35 40 45	
ACC GCT GGT GGT GCT GGT ACC GGA TCG AAT TGG CCA AGT TTA TTA ACC	192
Thr Ala Gly Gly Ala Gly Thr Gly Ser Asn Trp Pro Ser Leu Leu Thr	
50 55 60	
CTC ACT AAA GGG AAG GCC AAG TCG GCC GAG CTC GAA TTC GAT TCT GAT	240
Leu Thr Lys Gly Lys Ala Lys Ser Ala Glu Leu Glu Phe Asp Ser Asp	
65 70 75 80	
GAC AGA GTC ACT CCA CCA GCT GAA CCA TTG GAT AGA ATG CCA GAT CCA	288
Asp Arg Val Thr Pro Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro Asp Pro	
85 90 95	
TAC AGA CCA TCT TAC GGT AGA GCT GAA ACT GTT GTC AAC AAC TAC ATT	336
Tyr Arg Pro Ser Tyr Gly Arg Ala Glu Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile	
100 105 110	
AGA AAG TGG CAA CAA GTC TAC TCT CAC AGA GAT GGT AGA AAG CAA CAA	384
Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Arg Lys Gln Gln	
115 120 125	
ATG ACT GAA GAA CAA AGA GAA TGG TTG TCT TAC GGT TGT GTT GGT GTT	432

Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu Trp Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val	
130 135 140	
ACT TGG GTT AAC TCT GGT CAA TAC CCA ACT AAC AGA TTG GCT TTC GCT	480
Thr Trp Val Asn Ser Gly Gln Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala	
145 150 155 160	
TCT TTC GAT GAA GAT AGA TTC AAG AAC GAA TTG AAG AAC GGT AGA CCA	528
Ser Phe Asp Glu Asp Arg Phe Lys Asn Glu Leu Lys Asn Gly Arg Pro	
165 170 175	
AGA TCC GGT GAA ACT AGA GCT GAA TTC GAA GGT AGA GTT GCT AAG GAA	576
Arg Ser Gly Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Val Ala Lys Glu	
180 185 190	
TCT TTC GAT GAA GAA AAG GGT TTC CAA AGA GCT AGA GAA GTT GCT TCT	624
Ser Phe Asp Glu Glu Lys Gly Phe Gln Arg Ala Arg Glu Val Ala Ser	
195 200 205	
GTT ATG AAC AGA GCT CTA GAA AAC GCT CAC GAT GAA TCT GCT TAC TTG	672
Val Met Asn Arg Ala Leu Glu Asn Ala His Asp Glu Ser Ala Tyr Leu	
210 215 220	
GAT AAC TTG AAG AAG GAA TTG GCC AAC GGT AAC GAT GCT TTG AGA AAC	720
Asp Asn Leu Lys Lys Glu Leu Ala Asn Gly Asn Asp Ala Leu Arg Asn	
225 230 235 240	
GAA GAT GCT AGA TCC CCA TTC TAC TCT GCT TTG AGA AAC ACT CCA TCT	768
Glu Asp Ala Arg Ser Pro Phe Tyr Ser Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser	
245 250 255	
TTC AAG GAA AGA AAC GGT GGT AAC CAC GAT CCA TCC AGA ATG AAG GCT	816
Phe Lys Glu Arg Asn Gly Gly Asn His Asp Pro Ser Arg Met Lys Ala	
260 265 270	
GTT ATT TAC TCT AAG CAC TTC TGG TCT GGT CAA GAT AGA TCT TCT TCT	864
Val Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser Gly Gln Asp Arg Ser Ser Ser	
275 280 285	
GCT GAT AAG AGA AAG TAC GGT GAT CCA GAT GCT TTC AGA CCA GCT CCA	912
Ala Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro Asp Ala Phe Arg Pro Ala Pro	
290 295 300	
GGT ACC GGT TTG GTC GAC ATG TCC AGA GAT AGA AAC ATT CCA AGA TCC	960
Gly Thr Gly Leu Val Asp Met Ser Arg Asp Arg Asn Ile Pro Arg Ser	
305 310 315	
CCA ACT TCT CCA GGT GAA GGT TTC GTC AAC TTC GAT TAC GGT TGG TTC	1008
Pro Thr Ser Pro Gly Glu Gly Phe Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe	
320 325 330	
GGT GCT CAA ACT GAA GCT GAT GCT GAT AAG ACT GTT TGG ACC CAT GGT	1056
Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp Lys Thr Val Trp Thr His Gly	
335 340 345	
AAC CAC TAC CAC GCT CCA AAC GGT TCT TTG GGT GCT ATG CAC GTC TAC	1104
Asn His Tyr His Ala Pro Asn Gly Ser Leu Gly Ala Met His Val Tyr	
350 355 360	
GAA TCT AAG TTC AGA AAC TGG TCT GAA GGT TAC TCT GAT TTC GAT AGA	1152
Glu Ser Lys Phe Arg Asn Trp Ser Glu Gly Tyr Ser Asp Phe Asp Arg	
365 370 375	
GGT GCT TAC GTT ATT ACT TTC ATT CCA AAG TCT TGG AAC ACT GCT CCA	1200
Gly Ala Tyr Val Ile Thr Phe Ile Pro Lys Ser Trp Asn Thr Ala Pro	
380 385 390 395	

GAC AAG GTC AAG CAA GGT TGG CCA TAATGA
Asp Lys Val Lys Gln Gly Trp Pro

1230

400

【0072】

【発明の効果】本発明により、BTGを不活性融合タンパク封入体として生産させることにより、従来大腸菌では高発現しなかったBTGを大量生産することが可能になった。また、この不活性融合タンパク封入体から活性のあるBTGを得ることが可能になった。さらに、本発明は、BTGの遺伝子工学的・タンパク工学的解析への

道を開き、ひいてはBTG改良体の大量生産を可能にするものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】発現プラスミドpGEM260BTGの構築図である。

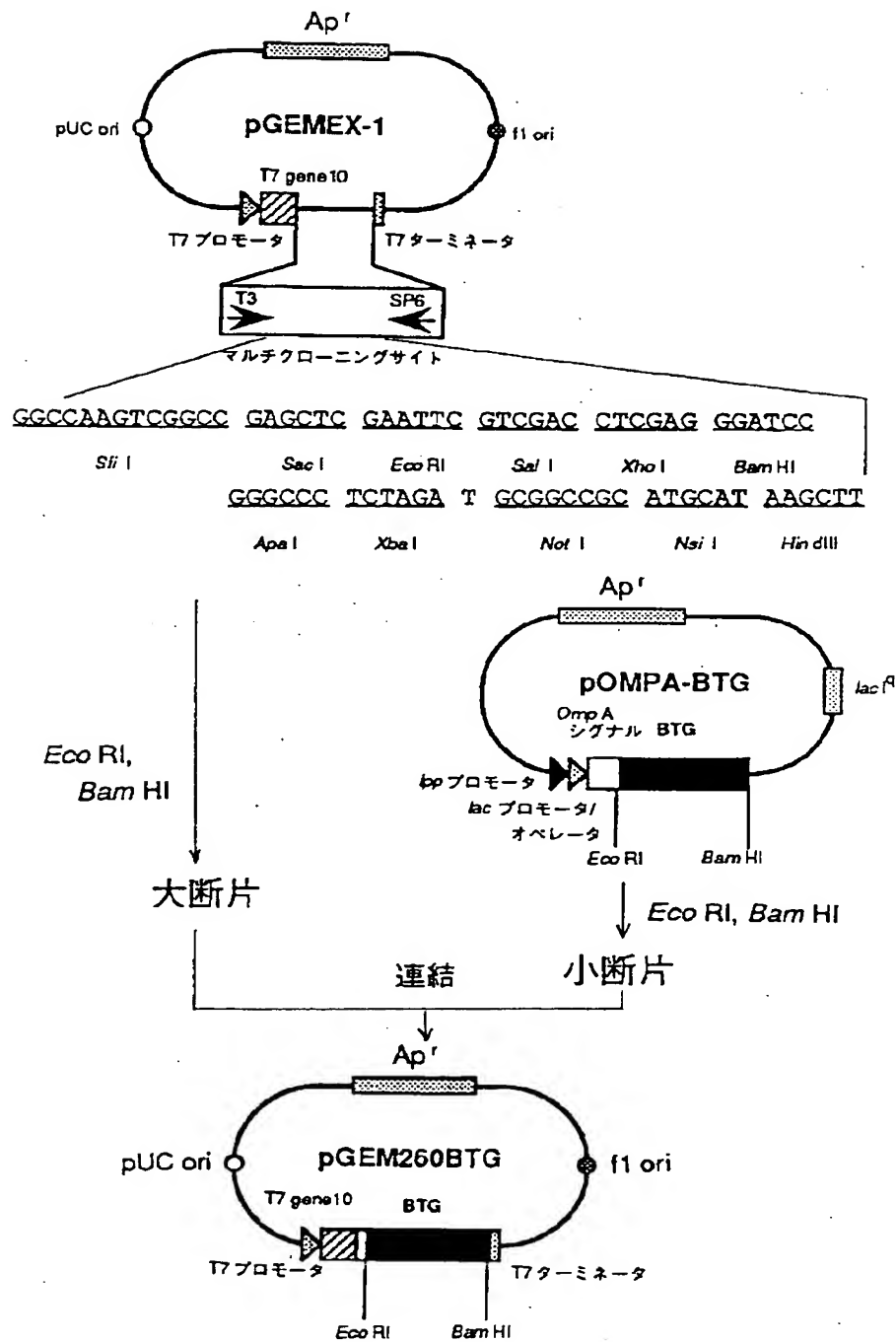
【図2】発現プラスミドpGEM77BTGの構築図である。

【図3】発現プラスミドpGEM15BTG(Xa)の構築図であ

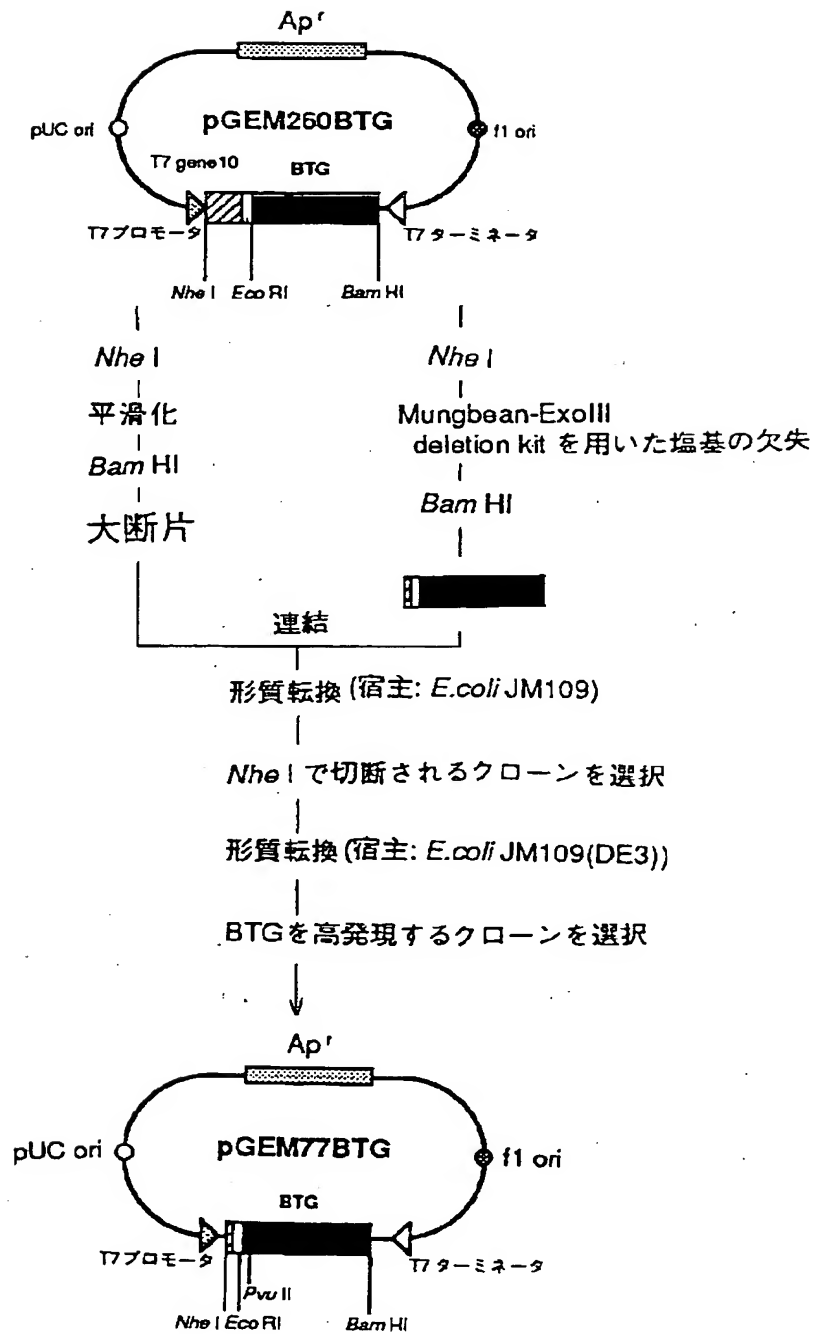
る。

10

【図1】



【図2】



【図3】

